截形叶螨抗哒螨灵品系和敏感品系体内解毒酶活性的变化

宋丽雯，沈一凡，岳秀利，郭金梅，沈慧敏*

（甘肃农业大学草业学院，草业生态系统省部共建教育部重点实验室，中-美草地畜牧业可持续发展中心，兰州 730070）

摘要：【目的】通过对截形叶螨 *Tetranychus truncatus* Ehara 抗哒螨灵品系体内解毒酶活性分析和增效剂与哒螨灵混用的增效作用测定，明确截形叶螨对哒螨灵的抗性动态及抗性机理，获得抗性治理的途径。【方法】采用室内生测法培育截形叶螨抗哒螨灵品系，微量滴度酶标板测定抗性和敏感品系体内解毒酶比活性、米氏常数（K_m）及最大反应速度（V_{max}），再用增效醚（PBO）、顺丁烯二酸二乙酯（DEM）和磷酸三甲苯酯（TPP）进行增效作用测定。【结果】室内筛选的截形叶螨对哒螨灵产生了抗性，筛选至 49 代，抗性倍数达到 955.25；PBO，TPP 和 DEM 对哒螨灵药剂有不同程度的增效作用，相对增效系数分别为 95.97%，85.14% 和 97.37%；抗哒螨灵品系体内的羧酸酯酶（CarE）、谷胱甘肽转移酶（GSTs）、多功能氧化酶（MFO）活性较敏感品系显著性提高（$P<0.05$），酸性磷酸酯酶（ACP）和碱性磷酸酯酶（ALP）的活性与敏感品系差异不大（$P>0.05$）；抗性品系中的 CarE，GSTs 和 MFO 3 种解毒酶的米氏常数（K_m）下降，最大反应速度（V_{max}）高于敏感品系。【结论】截形叶螨对哒螨灵产生抗性可能与其体内 CarE，GSTs 和 MFO 3 种解毒酶与底物的亲和力提高和代谢能力增强有关；3 种增效剂（PBO，TPP 和 DEM）与哒螨灵混用能提高对截形叶螨的毒杀效果。

关键词：截形叶螨；哒螨灵；抗性品系；敏感品系；解毒酶；抗性；增效剂；米氏常数

中图分类号：Q965.9 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2014)03-0323-07

Change of detoxification enzyme activities in the pyridaben-resistant and susceptible strains of *Tetranychus truncatus* (Acarina: Tetranychidae)

SONG Li-Wen, SHEN Yi-Fan, YUE Xiu-Li, GUO Jin-Mei, SHEN Hui-Min* (Sino-U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Ministry of Education, College of Prataculture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: 【Aim】To clarify the resistance mechanisms of *Tetranychus truncatus* Ehara to pyridaben by detecting the change of detoxification enzyme activities and the synergism of synergists to pyridaben. 【Methods】The experiment was carried out in laboratory by biological assay. The specific activity, the Michaelis constant (K_m) and the maximum reaction velocity (V_{max}) of several detoxification enzymes in pyridaben-resistant strain (Py-R) and susceptible strain (SS) were detected by microplate reader. Then the synergistic effects of piperonyl butoxide (PBO), diethyl maleate (DEM) and icresyl phosphate (TPP) to pyridaben were detected in Py-R and SS. 【Results】The resistance of Py-R at the 49th generation selected with pyridaben increased to 955.25-fold as high as that of SS. The piperonyl butoxide (PBO), triphenyl phosphate (TPP) and diethylmaleate (DEM) enhanced the toxicity of pyridaben, and the relative synergistic coefficients of 3 synergists to pyridaben were 95.97%, 85.14% and 97.37%, respectively. The activities of carboxylesterases (CarE), glutathione-S-transferase (GSTs) and mixed function oxidase (MFO) in Py-R significantly increased compared with those in SS ($P<0.05$), while the activities of acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (ALP) had no significant difference between Py-R and SS ($P>0.05$). The K_m values of CarE, GSTs and MFO in Py-R were lower than those in SS, while their V_{max} values in Py-R were higher than those in SS. 【Conclusion】The increased activity of CarE, GSTs and MFO, and higher affinity with substrate might be the main resistance

基金项目：公益性行业（农业）科研专项（201103020）；国家自然科学基金项目(31260442)；甘肃省科技计划资助项目(1308RJYA053)

作者简介：宋丽雯，女，1981 年生，甘肃两当县人，博士研究生，讲师，研究方向为有害生物综合治理和害虫抗药性，E-mail：songlw@gsau.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author，E-mail：ndshm@gsau.edu.cn

收稿日期 Received：2013-09-25；接受日期 Accepted：2013-12-18

mechanisms to Py-R of *T. truncatus*. When 3 synergists (PBO, TPP and DEM) and pyridaben are mixed, a higher level of virulence to *T. truncatus* would be exhibited.

Key words: *Tetranychus truncatus*; pyridaben; resistant strain; susceptible strain; detoxification enzyme; resistance; synergist; Michaelis constant

截形叶螨 *Tetranychus truncatctus* Ehara 是我国棉花、玉米、大豆等大田作物及蔬菜上的主要害螨之一。自 20 世纪 90 年代以来,该螨在我国北方玉米产区的危害日趋加重,成为影响玉米生产的主要因素之一。截形叶螨个体小,繁殖快,适应性强,是典型的 R 类害虫。该螨破坏植物的正常生理机能,引起作物落叶、落花和落果,轻则造成减产、削弱长势,重则失收或整株死亡。

近年来,甘肃河西玉米杂交制种发展迅速,已经成为我国最大的杂交玉米种子生产基地(吕小瑞, 2013)。而截形叶螨的为害严重影响了制种玉米的产量和质量,给甘肃制种业造成很大的损失(何文等, 2012)。哒螨灵是由日本化学公司在 20 世纪 80 年代开发出来的,属于线粒体电子传导抑制剂类的杀螨剂(METI),作用方式为在复合物 Ⅰ 的 NADH-辅酶 Q 还原酶位点抑制线粒体电子传递链(Kim *et al.*, 2004)。关于截形叶螨抗性机制研究的报道仅见于范志金和陈年春(1996),他们研究了截形叶螨对久效磷、三氟氯氰菊酯和三氯杀螨醇 3 种代表性药剂的抗性机制。此后未见截形叶螨对其他杀螨剂抗性机理的相关报道。为明确截形叶螨对哒螨灵的抗性机理,拟通过生化分析和增效剂生物测定两种方法,研究室内汰选出的截形叶螨抗哒螨灵品系体内解毒酶的活性差异以及增效剂对哒螨灵的增效作用,为其田间抗性治理及分子抗性机理研究奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 供试螨类

截形叶螨敏感品系(susceptible strain, SS)采自甘肃农业大学未接触过任何农药的玉米试验田,在实验室内采用雌雄单系(1 雌 1 雄用在培养皿中饲养)繁殖饲养,然后将其后代转移到盆栽菜豆苗连续饲养约 90 代,不接触任何药剂。截形叶螨抗哒螨灵品系(pyridaben-resistant strain, Py-R)从敏感品系中分出截形叶螨部分个体,以哒螨灵杀死种群 70% 左右个体的浓度进行汰选,经过连续 49 代的抗性选育,获得抗性指数达 955.25 的抗性很高的品系。

1.2 供试试剂和仪器

15% 哒螨灵乳油(江苏蓝丰生物化工股份有限公司);α-萘酚(α-naphthol)(天津市光复精细化工研究所);α-醋酸萘酯(α-NA)(天津市光复精细化工研究所);毒扁豆碱(eserine)(Sigma,北京生物有限公司);坚固蓝 B 盐(fast blue salt)(北京生物有限公司);考马斯亮蓝 G-250(天津市光复精细化工研究所);牛血清蛋白(BSA)(上海源聚生物科技有限公司);对硝基苯酚(*p*-nitrophenol)(山东淄博化学试剂厂);对硝基苯基磷酸二钠(4-nitrophenyl phosphate disodium salt)(山东淄博化学试剂厂);一氯-2,4-二硝基苯(CDNB)(生工生物工程(上海)有限公司);还原性谷胱甘肽(GSH)(北京生物有限公司);还原性辅酶Ⅱ(NADPH)(北京拜耳迪生物公司);对硝基苯甲醚(*p*-NA)(河北恒业精细化工有限公司);增效剂 94% 增效醚原油(piperonyl butoxide, PBO)(湖南湘潭精细化工研究所)、97% 顺丁烯二酸二乙酯原油(diethyl maleate, DEM)(生工生物工程(上海)有限公司)、98% 磷酸三苯酯(triphenyl phosphate, TPP)(上海化学试剂一厂);HERMLE Z323K 高速冰冻离心机(日本);ELX 800UV 酶标仪(Bio-Tek Instruments)

1.3 截形叶螨抗哒螨灵品系的选育

从敏感品系中分出截形螨部分个体,待扩繁后用哒螨灵连续处理 49 代。每喷 3 ~ 5 次药剂进行一次室内毒力测定,设置 7 个浓度梯度,每一浓度取 30 头螨,重复 3 次,计算其致死中浓度(LC_{50}),并与敏感品系比较,求出抗性指数(resistance index, RI),掌握抗药性的发展趋势。RI = 抗性品系中的 LC_{50}/敏感品系中的 LC_{50}。每个品系的起始代用 F_0 表示,药剂筛选后第 1,2,…n 代,分别以 F_1,F_2,…Fn 表示。

1.4 3 种增效剂对哒螨灵的增效作用

以 Py-R 品系第 49 代和 SS 品系为试虫,将 3 种增效剂[增效醚(PBO)、顺丁烯二酸二乙酯(DEM)和磷酸三苯酯(TPP)]与哒螨灵按有效成分 3∶1 的比例混合,参照玻片浸渍法测定增效剂与哒螨灵混剂对截形叶螨的毒力,比较 LC_{50} 值,计算增效比(synergistic ratio)和相对增效系数 r_0(relative synergistic coefficient),相关计算公式参照何林

(2003)。

增效比 = 单剂的 LC_{50} 值/(单剂 + 增效剂)的 LC_{50} 值。

$$r_0(\%) = \frac{A - B}{C} \times 100$$

其中：A = 单剂对抗性品系的 LC_{50} -(单剂 + 增效剂)对抗性品系的 LC_{50}；B = 单剂对敏感品系的 LC_{50} -(单剂 + 增效剂)对敏感品系的 LC_{50}；C = 单剂对抗性品系的 LC_{50}。如果 r_0 值明显大于 0，则表示增效剂所抑制的酶与抗药性形成有关。

截形叶螨毒力测定方法采用 FAO 推荐的玻片浸渍法(slide-dip method)。试验时把双面胶带贴在载玻片一端，每块玻片粘雌成螨 30 头，每一处理 3 个重复，以蒸馏水为对照。根据数据求出哒螨灵对截形叶螨敏感品系(SS)、抗性品系(Py-R)的毒力回归式、坡度、LC_{50} 和 95% 置信限，并用 χ^2 进行检验。

1.5　截形叶螨抗性品系解毒酶活性分析

1.5.1　酶源制备：抗性品系和敏感品系中各挑取 150 头雌成螨，用 2 mL 冷冻缓冲液匀浆，4℃ 10 000 g 下离心 15 min，取上清液备用。酶源蛋白质含量测定参照 Bradford 的考马斯亮蓝 G-250 染色法测定法(Bradford，1976)。选取 3 个不同时间段的雌成螨作为生物重复 3 次，技术重复 3 次，共 9 次重复，最后取平均值。

1.5.2　解毒酶活性分析：羧酸酯酶(CarE)的活性测定参照 Van Leeuwen 等(2006)，酸性磷酸酯酶(ACP)和碱性磷酸酯酶(ALP)活性的测定参照何林(2003)和何恒果(2010)；谷胱甘肽 S-转移酶(GSTs)活性测定参照 Tirello(2012)；多功能氧化酶(MFOs)活性测定参照 Stumpf 和 Nauen(2001)以及 Kim(2006)。

1.5.3　解毒酶米氏常数(K_m)和最大反应速度(V_{max})的测定：测定方法同上述解毒酶活性测定方法，其中不同浓度设置参照何恒果(2010)，根据测定结果用双倒数作图法求得 K_m 值和 V_{max} 值。

1.6　数据统计与分析

所有数据处理分析均用 DPS，Excel 和SPSS19.0 软件进行。抗性选育结果用 DPS 软件分析处理；不同解毒酶数据处理，用 Excel 软件进行统计分析；差异显著性分析用 SPSS19.0 软件中的 Duncan 氏新复极差法分析。

2　结果与分析

2.1　截形叶螨对哒螨灵抗性品系选育结果

截形叶螨对哒螨灵抗性选育结果(表 1)表明，用哒螨灵对截形叶螨敏感品系处理 49 代后，其 LC_{50} 值由 17.08 mg/L 上升至 16 334.68 mg/L，抗性倍数达到 955.25 倍。截形叶螨对哒螨灵的抗性上升分为 $F_0 - F_5$，$F_6 - F_{20}$，$F_{21} - F_{35}$ 和 $F_{36} - F_{49}$ 4 个阶段。$F_0 - F_5$ 代抗性进展极为缓慢，F_6-F_{20} 抗性发展较为迅速，然后从 F_{21} 开始抗性发展逐渐趋于稳定，到了 $F_{36} - F_{49}$ 后期抗性速度又急剧上升，其 LC_{50} 值由 4 180.65 mg/L 增加到 16 334.68 mg/L。因此哒螨灵对截形叶螨的抗性动态为初期抗性发展缓慢，前期抗性发展迅速，中期发展趋于稳定，后期抗性急剧上升。

表 1　截形叶螨对哒螨灵品系抗性选育结果

Table 1　Resistance selection of *Tetranychus truncatus* to pyridaben

筛选代数 Selection generation	回归方程 LC-P equation	相关系数 R Correlation efficient	卡方值 χ^2	LC_{50}(mg/L) (95% Confidence limits)	抗性指数 Resistance ratio
F_0(SS)	$y = 1.7925x + 2.7906$	0.9801	4.1878	17.08(11.015 - 22.702)	-
F_5	$y = 2.3293x + 1.0312$	0.9546	9.5941	50.57(42.440 - 58.339)	2.96
F_{10}	$y = 2.1788x - 0.4896$	0.9985	0.4259	330.78(278.416 - 385.713)	19.37
F_{15}	$y = 2.7672x - 3.0781$	0.9927	1.6618	830.33(686.343 - 954.752)	48.61
F_{20}	$y = 3.0398x - 4.7440$	0.9911	1.6699	1 604.94(1 383.276 - 1 809.575)	93.97
F_{25}	$y = 2.7471x - 4.3067$	0.9750	2.5183	2 442.69(1 936.686 - 2864.309)	143.01
F_{30}	$y = 3.7754x - 8.3194$	0.9942	0.6997	3 372.46(2 858.669 - 3 754.393)	197.45
F_{35}	$y = 4.6985x - 12.0145$	0.9716	3.5419	4 180.65(3 742.099 - 4 519.997)	244.77
F_{40}	$y = 3.135x - 6.9756$	0.9915	1.1539	6 606.70(5670.649 - 7 381.633)	386.81
F_{45}	$y = 2.2497x - 4.1579$	0.9765	2.8976	11 767.10(9 992.907 - 13 521.760)	688.94
F_{49}	$y = 0.7111x + 2.0039$	0.9805	1.8275	16 334.68(10 548.200 - 27 123.650)	955.25

抗性指数 = 抗性品系中的 LC_{50}/敏感品系中的 LC_{50}。Resistance index = LC_{50} in Py-R/LC_{50} in SS.

2.2 抗性品系和敏感品系中 3 种增效剂对哒螨灵的增效作用

从表 2 可以看出，在截形叶螨抗性品系和敏感品系中，PBO（多功能氧化酶 MFO 抑制剂），TPP（羧酸酯酶 CarE 抑制剂），DEM（谷胱甘肽转移酶 GSTs 抑制剂）与哒螨灵混用后，对哒螨灵药剂有不同程度的增效作用。其中在抗性品系中，PBO 和 DEM 品系的增效作用明显，增效比分别为 25.31 和 38.98，而 TPP 的增效比仅为 6.75；但它们的相对增效系数分别为 95.97%，97.37% 和 85.14%，均大于 0，因此可以初步证明截形叶螨对哒螨灵的抗性主要与体内 MFO，CarE，GSTs 这 3 种解毒酶有关。

表 2 3 种增效剂对哒螨灵的增效作用

Table 2 Synergistic effects of three synergists to pyridaben

药剂 Acaricide	品系 Strain	毒力回归方程 LC-P equation	相关系数 Correlation efficient R	LC_{50} (mg/L) (95% Confidence limits)	增效比 Synergistic ratio	相对增效系数(%) Relative synergistic coefficient r_0
哒螨灵	SS	$y = 1.7925x + 2.7906$	0.9643	17.08 (11.015 – 22.702)	–	–
Pyridaben	Py-R	$y = 0.7111x + 2.0039$	0.9805	16 334.68 (10 548.200 – 27 123.650)	–	–
哒螨灵 + 增效醚	SS	$y = 1.2115x + 3.7801$	0.9520	10.17 (6.310 – 13.982)	4.50	95.97
Pyridaben + PBO	Py-R	$y = 2.1379x - 2.2350$	0.9653	2 421.71 (1 648.700 – 3 076.580)	25.31	
哒螨灵 + 顺丁烯二酸	SS	$y = 1.5313x + 3.8591$	0.9815	5.56 (3.546 – 7.340)	1.68	85.14
二乙酯 Pyridaben + TPP	Py-R	$y = 1.0557x + 2.1087$	0.9881	547.97 (335.628 – 776.154)	6.75	
哒螨灵 + 磷酸三苯酯	SS	$y = 1.3398x + 3.9191$	0.9483	6.41 (4.259 – 8.344)	2.67	97.37
Pyridaben + DEM	Py-R	$y = 0.9205x + 2.5863$	0.9787	419.04 (217.495 – 645.210)	38.98	

增效比 = 单剂的 LC_{50} 值/(单剂 + 增效剂) 的 LC_{50} 值。Synergistic ratio = LC_{50} of acaricide/LC_{50} of acaricide plus synergist. 相对增效系数 Relative synergistic coefficient r_0 (%) = (A + B)/C. Py-R：抗哒螨灵品系 Pyridaben-resistant strain；SS：敏感品系 Susceptible strain. 下同 The same below.

2.3 截形叶螨抗哒螨灵品系（Py-R）解毒酶比活性分析

由表 3 可知，截形叶螨抗哒螨灵品系体内的羧酸酯酶（CarE）、谷胱甘肽转移酶（GSTs）、多功能氧化酶（MFO）3 种酶的活性明显高于敏感品系，且差异显著（$P < 0.05$）；酸性磷酸酯酶（ACP）和碱性磷酸酯酶（ALP）的活性虽然也高于敏感品系，但差异不显著（$P > 0.05$）。表明截形叶螨对哒螨灵的抗性主要与 CarE，GSTs 和 MFO 酶活性提高有关。

表 3 截形叶螨敏感和抗哒螨灵品系中的几种解毒酶活性

Table 3 Activities of several detoxification enzymes in SS and Py-R strains of *Tetranychus truncatus*

品系 Strain	CarE 活性 CarE activity (nmol/μg · 20 min)	ALP 活性 ALP activity (nmol/μg · 30 min)	ACP 活性 ACP activity (nmol/μg · 30 min)	GST 活性 GST activity (△OD/μg · min)	MFO 活性 MFO activity (nmol/μg · 30 min)
SS	7.294 ± 0.526 a	1.846 ± 0.677 a	2.606 ± 0.442 a	2.311 ± 0.470 a	0.042 ± 0.006 a
Py-R	8.817 ± 0.516 b	2.465 ± 0.677 a	2.759 ± 0.281 a	3.003 ± 0.516 b	0.051 ± 0.007 b

表中数据为平均值 ± 标准差；同列数据后不同字母者表示抗性品系和敏感品系经 Duncan 氏新复极差检验差异显著（$P < 0.05$）。Data in the table are mean ± *SE*, and different letters of the same column are significantly different between the susceptible strain and the resistant strain by Duncan's test ($P < 0.05$).

2.4 截形叶螨 Py-R 和敏感品系（SS）解毒酶米氏常数 K_m 及最大反应速度 V_{max} 比较

根据图 1 可求出各酶的 Km 值和 Vmax 值（表 4）。由表 4 可知，截形叶螨的抗哒螨灵品系和敏感品系相比，其 CarE，GSTs 和 MFO 这 3 种解毒酶的 K_m 值降低，而 V_{max} 值增大，表明抗性品系的三大解毒酶与底物的亲和力比敏感品系高。而抗性品系的 ACP 和 ALP 的 V_{max} 比敏感品系大，但 K_m 值也高于敏感品系，表明抗性品系体内的磷酸酯酶与底物的亲和力小，即截形叶螨对哒螨灵产生抗性与磷酸酯酶关系不大。

表 4 截形叶螨抗性和敏感品系几种解毒酶米氏常数 K_m 及最大反应速度 V_{max}

Table 4 Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) of several detoxification enzymes in Py-R and SS of *Tetranychus truncatus*

解毒酶 Detoxification enzymes	米氏常数 K_m (nmol)		最大反应速度 V_{max} (nmol/μg · min)	
	SS	Py-R	SS	Py-R
CarE	2.671	2.592	71.429	76.923
ACP	0.893	1.111	2.829	3.568
ALP	0.532	0.712	1.314	1.756
GSTs	83.800	65.148	9.320	9.970
MFO	21.459	20.446	0.305	0.332

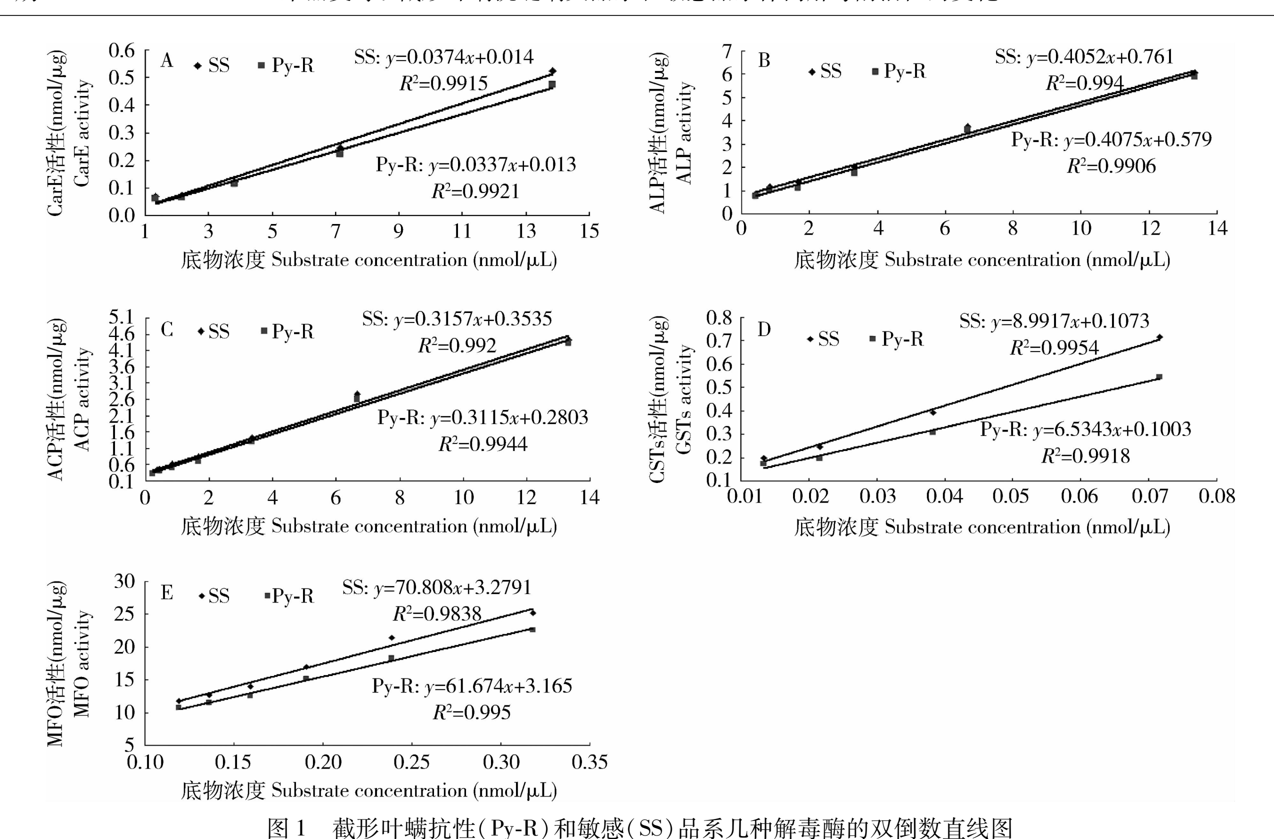


图 1　截形叶螨抗性(Py-R)和敏感(SS)品系几种解毒酶的双倒数直线图

Fig. 1　Lineweaver-Burk chart of several detoxification enzymes in the pyridaben-resistant (Py-R) and susceptible (SS) strains of *Tetranychus truncatus*

A：羧酸酯酶 Carboxylesterases (CarE)；B：碱性磷酸酯酶 Alkaline phosphatase (ALP)；C：酸性磷酸酯酶 Acid phosphatase (ACP)；D：谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathione-S-transferases (GSTs)；E：多功能氧化酶 Mixed function oxidase (MFO).

3　讨论与结论

本文用哒螨灵对截形叶螨抗性品系处理到第 49 代，其 LC_{50} 值由 17.08 mg/L 上升至 16 334.68 mg/L，抗性倍数达到 955.25 倍。哒螨灵对截形叶螨抗性动态为初期抗性发展缓慢，前期抗性迅速发展，中期趋于稳定，后期抗性急剧上升，抗性动态与叶螨对杀螨剂产生抗性趋势一致。通过对截形叶螨抗哒螨灵品系解毒酶活性比较分析和 3 种增效剂对哒螨灵的增效作用测定，表明截形叶螨对哒螨灵产生抗性主要与体内 CarE，GSTs 和 MFO 3 种解毒酶活性增强有关，这与前人研究结果一致(赵卫东，2002；李晓芳，2007；高新菊，2009；朱新军，2011)。

哒螨灵属于线粒体电子传导抑制剂类的杀螨剂(METI)，自从 1994 年在日本静冈县茶园发现神泽氏叶螨对该类药剂产生了抗性后(Ozawa，1994)，关于叶螨对 METI 类杀螨剂产生抗药性的报道越来越多。比如 Cho 等(1995)，Bylemans 和 Meurrens (1997)，Herron 和 Rophail (1998)以及 Devine (2001)报道过草莓和苹果上的二斑叶螨对吡螨胺产生了抗性。曹煜等(1993)、沈慧敏等(2000)、赵卫东等(2001)、何林等(2003)和丁天波等(2012)报道过不同种的叶螨都对哒螨灵产生了不同程度的抗药性。

近几年，国内外对 METI 类杀螨剂抗性机制的研究主要集中在对二斑叶螨的研究上，关于截形叶螨的研究未见报道。多数研究结果认为二斑叶螨对哒螨灵、吡螨胺、喹螨醚、唑螨酯等 METI 类杀螨剂产生抗性与其体内多功能氧化酶、多功能氧化酶、谷胱甘肽 S-转移酶、磷酸酯酶等解毒酶有着重大关系。如 Kim 等(2006)研究了二斑叶螨对哒螨灵的多重抗性和生化抗性，表明 MFO 活性的提高对抗性形成起至关重要的作用；陈文博(2011)发现谷胱甘肽 S-转移酶、多功能氧化酶、酸性磷酸酯酶和碱性磷酸酯酶在抗哒螨灵品系和敏感品系中均表现出差异性；刘庆娟等(2012)认为二斑叶螨对哒螨灵抗性的增强可能与羧酸酯酶有关。

在害虫抗药性研究中，增效剂诊断法常作为害

虫抗性生化机理的研究方法,因此可以利用增效剂的增效作用来判断相应的酶是否参与了抗药性的形成。如 Van Pottelberge 等(2009)等增效剂研究表明哒螨灵抗性产生与 PBO 和 DEF 相关,而这两种增效剂分别是多功能氧化酶和磷酸酯酶的抑制剂。本研究通过增效剂和酶活性测定结果发现截形叶螨对哒螨灵产生抗性主要 PBO,TPP 和 DEM 相关,即与 CarE,GSTs 和 MFO 3 种解毒酶的活性增强有关,而与磷酸酯酶,即 ACP 和 ALP 相关性不大。本结果与 Van Pottelberge 等(2009)和陈文博(2011)的结果不太一致,其原因可能与研究的叶螨种类不同和对杀螨剂的抗性水平不同所致,表明不同种的叶螨对农药产生的抗性的机理不同。此外,在用哒螨灵防治截形叶螨时,除了一些常规的措施外,如其他药剂轮用,减少使用哒螨灵的使用次数和用量等,还可以考虑使用适宜的增效剂(如 PBO,TPP 和 DEM),这样不仅可以提高哒螨灵对截形叶螨的防效,同时可以更好地延缓抗药性的产生。

酶动力学研究主要涉及对 V_{max} 及 K_m 值的研究。V_{max} 为最大反应速度,表示反应的快慢,K_m 为酶促反应中 3 个解离常数的复合函数,表示酶促反应速度达到最大反应速度一半时的底物浓度,即米氏常数。在昆虫抗药性机制研究中,K_m 和 V_{max} 值常作为分析解毒酶质变和量变的依据。K_m 值主要反映了酶与底物结合的性质,K_m 值大,表示酶与底物的亲合力小,K_m 值小,表示酶与底物亲合力大。本研究发现,截形叶螨抗哒螨灵品系体内 3 种解毒酶的米氏常数 K_m 值降低,最大反应速率 V_{max} 增大,表明 3 种解毒酶与底物(哒螨灵)的亲和力提高,进一步证实了解毒活性增强是截形叶螨对哒螨灵产生抗性的重要机制,但其分子抗性机理还有待于进一步证实。

参考文献 (References)

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 – 254.

Bylemans D, Meurrens F, 1997. Anti-resistance strategies for the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), in strawberry culture. *Acta Hortic.*, 439: 869 – 876.

Cao Y, Liu ML, Wang MN, 1993. Resistance to three insecticides of *Tetranychus cinnabarinus* and *T. truncatus* in Henan and Ningxia provinces. *Plant Protection*, 19(2): 12 – 14. [曹煜, 刘明丽, 王美男, 1993. 河南和宁夏朱砂叶螨、截形叶螨对 3 种药剂的抗性检测. 植物保护, 19(2): 12 – 14]

Chen WB, 2011. Study on Resistance Mechanisms and Resistance Fitness of *Tetranychus turkestani* Ugarov *et* Nikolski to Abamectin and Pyridaben. MSc Thesis, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang. [陈文博, 2011. 土耳其斯坦叶螨抗阿维菌素和哒螨灵品系的适合度及代谢抗性机理研究. 新疆石河子: 石河子大学硕士学位论文]

Cho JR, Yoo JK, Kim YJ, Ahn YJ, 1995. Monitoring of acaricide resistance in field collected populations of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in Korea. *Korean Applied Entomology*, 31: 40 – 45.

Devine GJ, Barber M, Denholm I, 2001. Incidence and inheritance of resistance to METI-acaricides in European strains of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) (Acari: Tetranychidae). *Pest Management Science*, 57: 443 – 448.

Ding TB, Niu JZ, Xia WK, Sun QQ, Dou W, Wang JJ, 2012. Susceptibility to acaricides and detoxification enzyme activity of four field populations of *Panonychus citri*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(2): 382 – 389. [丁天波, 牛金志, 夏文凯, 孙倩倩, 豆威, 王进军, 2012. 柑橘全爪螨田间种群敏感性测定及三种主要解毒酶活性比较. 应用昆虫学报, 49(2): 382 – 389]

Fan ZJ, Chen NC, 1996. Studies on the insecticidal resistance mechanisms of cotton spider mite. *Acta Phytophylacica Sinica*, 23(2): 175 – 180. [范志金, 陈年春, 1996. 截形叶螨抗药性主导机制的研究. 植物保护学报, 23(2): 175 – 180]

Gao XJ, 2009. Study on Resistance Mechanisms and Enzymology Resistance Monitoring of *Tetranychus urticae* Koch to Fenpropathrin. MSc Thesis, Gansu Agricultural University, Lanzhou. [高新菊, 2009. 二斑叶螨对甲氰菊酯的抗性机理及其酶学抗性监测研究. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文]

He HG, 2010. Fenpropathrin and Avermectin Resistance, and Esterase Gene Cloning and Expression in *Panonychus citri* (McGregor). PhD Dissertation, Southwest University, Chongqing. [何恒果, 2010. 桔全爪螨对甲氰菊酯和阿维菌素的抗性及其酯酶基因的克隆与表达研究. 重庆: 西南大学博士学位论文]

He L, 2003. Study on Pesticide Resistance Mechanisms and Resistant Fitness of *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval). PhD Dissertation, Southwest Agricultural University, Chongqing. [何林, 2003. 朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 抗药性机理及抗性适合度研究. 重庆: 西南农业大学博士学位论文]

He L, Zhao ZM, Deng XP, Wang JJ, Liu H, Liu YH, 2003. Resistance selection of *Tetranychus cinnabarinus* to three acaricides and its management strategy. *Scientia Agricultura Sinica*, 36(4): 403 – 408. [何林, 赵志模, 邓新平, 王进军, 刘怀, 刘映红, 2003. 朱砂叶螨对 3 种杀螨剂的抗性选育及抗性治理研究. 中国农业科学, 36(4): 403 – 408]

He W, Liang W, Zhang YM, Shi Q, Wang LR, Zhou FM, 2012. Prevention and control technology of corn red spider in Zhangye city. *Modern Agricultural Science and Technology*, 16: 154. [何文, 梁武, 张玉梅, 石琴, 王立荣, 周福铭, 2012. 张掖市制种玉米红蜘蛛防控技术. 现代农业科技, 16: 154]

Herron GA, Rophail J, 1998. Tebufenpyrad (Pyranica) resistance detected in two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) from apples in Western Australia.

Experimental and Applied Acarology, 22: 633 – 641.

Kim M, Shin DY, Suh E, Cho K, 2004. An assessment of the chronic toxicity of fenpyroximate and pyridaben to *Tetranychus urticae* using a demographic bioassay. *Applied Entomology and Zoology*, 39: 401 – 409.

Kim YJ, Park HM, Cho JR, Ahn YJ, 2006. Multiple resistance and biochemical mechanisms of pyridaben resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 99(3): 954 – 958.

Li XF, 2007. Study on Mechanisms and Esterase Gene cDNA Cloning and Sequence Analysis from *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). MSc Thesis, Southwest University, Chongqing. [李晓芳, 2007. 朱砂叶螨抗性机理初步研究及酯酶 cDNA 克隆与序列分析. 重庆: 西南大学硕士学位论文]

Liu QJ, Liu YJ, Yu Y, Zhou XH, Ma H, 2012. The study on resistance and its mechanism of *Tetranychus urticae* to several common insecticides. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(2): 376 – 381. [刘庆娟, 刘永杰, 于毅, 周仙红, 马慧, 2012. 二斑叶螨对七种杀螨剂的抗药性测定及其机理研究. 应用昆虫学报, 49(2): 376 – 381]

Lv XR, 2013. The idea and measure of management of maize producing base in Gansu. *Agricultural Technology and Information*, (2): 27 – 29. [吕小瑞, 2013. 强化甘肃省玉米制种基地管理的思路和对策. 农业科技与信息, (2): 27 – 29]

Ozawa A, 1994. Acaricide susceptibility of Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acarina: Tetranychidae) collected from tea [*Camellia sinensis*] fields in Chuuen and Ogasa district in Shizuoka prefecture. *Bulletin of Tea Research*, 79: 1 – 14.

Shen HM, Zhang XH, Chen L, Lu NH, 2000. Study on insecticide-resistance of *Eotetranychus pruni* (Oudemans) to 14 insecticides and acaricides. *Journal of Gansu Sciences*, 12(4): 29 – 32. [沈慧敏, 张新虎, 陈琳, 陆宁海, 2000. 李始叶螨对 14 种杀虫杀螨剂的抗性研究. 甘肃科学学报, 12(4): 29 – 32]

Stumpf N, Nauen R, 2001. Cross-resistance, inheritance and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Economic Entomology*, 94: 1577 – 1583.

Tirello P, Pozzebon A, Cassanelli S, Van Leeuwen T, Duso C, 2012. Resistance to acaricides in Italian strains of *Tetranychus urticae*: toxicological and enzymatic assays. *Exp. Appl. Acarol.*, 57: 53 – 64.

Van Leeuwen T, Tirrya L, Nauen R, 2006. Complete maternal inheritance of bifenazate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) and its implications in mode of action considerations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 869 – 877.

Van Pottelberge S, Van Leeuwen T, Nauen R, Tirry L, 2009. Resistance mechanisms to mitochondrial electron transport inhibitors in a field-collected strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Bulletin of Entomological Research*, 99: 23 – 31.

Zhao WD, 2002. Studies on Insecticide Resistance and Mechanism of *Tetranychus urticae*. MSc Thesis, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong. [赵卫东, 2002. 二斑叶螨的抗药性及其机理研究. 山东泰安: 山东农业大学硕士学位论文]

Zhao WD, Wang KY, Jiang XY, Yi MQ, 2001. The monitoring of resistance of *Tetranychus urticae* Koch to several insecticides. *Chinese Journal of Pesticide Science*, (3): 86 – 88. [赵卫东, 王开运, 姜兴印, 仪美芹, 2001. 二斑叶螨对常用杀螨剂的抗药性测定. 农药学学报, (3): 86 – 88]

Zhu XJ, 2011. Study on the Relationship between the Resistance to Avermectin in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) and γ-Aminobutyric Acid and Related Enzymes Activity. MSc Thesis, Southwest University, Chongqing. [朱新军, 2011. γ-氨基丁酸及其相关酶活性与朱砂叶螨对阿维菌素抗性的关系研究. 重庆: 西南大学硕士学位论文]

(责任编辑: 赵利辉)